

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-42874

(43)公開日 平成10年(1998)2月17日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	Z NA	9282-4B	C 12 N 15/00	Z NAA
C 07 H 21/04			C 07 H 21/04	B
C 12 N 9/12			C 12 N 9/12	
C 12 Q 1/68		7823-4B	C 12 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数30 O.L (全 27 頁)

(21)出願番号 特願平8-200446	(71)出願人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日 平成8年(1996)7月30日	(72)発明者 小松原 秀介 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
	(72)発明者 北林 雅夫 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
	(72)発明者 上村 秀喜 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物

(57)【要約】

【課題】核酸の増幅効率が優れた耐熱性DNAポリメラーゼ組成物を提供する。

【解決手段】改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼに比べて、0 ~ 5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第1DNAポリメラーゼ)および3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100 ~ 6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第2DNAポリメラーゼ)を含み、第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼが少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH 8.8にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物である。該組成物を使用することにより長鎖核酸の増幅も可能となる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 改変前の3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0～5%である3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第1 DNAポリメラーゼ）および3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%である3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第2 DNAポリメラーゼ）を含み、第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼが、少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH 8.8（25°Cでの測定値）にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項2】 第2 DNAポリメラーゼの活性が、第1 DNAポリメラーゼの活性よりも小さい請求項1項記載の核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項3】 第1 DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2 DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位である請求項1記載の核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項4】 第1 DNAポリメラーゼの3' - 5' エキソスクレアーゼ活性が、改変前の耐熱性DNAポリメラーゼの3' - 5' エキソスクレアーゼ活性に比べて、約1%以下に低下したものである請求項1項記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項5】 第1 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1項記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8（25°Cでの測定値）にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【請求項6】 第1 DNAポリメラーゼが下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8（25°Cでの測定値）にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項7】 第1 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソスクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8（25°Cでの測定値）にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

【請求項8】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項9】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項10】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項11】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項12】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項13】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項14】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ

である請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。  
作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒  
熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

10

【請求項15】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X<sub>1</sub>、D X<sub>2</sub>、EX<sub>3</sub>、モチーフのうち、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、およびX<sub>3</sub>の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項16】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項17】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【請求項18】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項19】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項20】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項21】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをグルタミンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項22】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項23】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項24】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第144番目のスレオニンをバリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項25】 下記第1 DNAポリメラーゼおよび下記第2 DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物。

第1 DNAポリメラーゼ：

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、

50 第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタ

ミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

第2 DNAポリメラーゼ：

作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも120塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88~90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

または

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100~30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも120塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88~90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【請求項26】 DNAを鋳型とし、プライマー、dNTPおよび請求項1~25のいずれか1項記載の核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物を含む試薬を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸增幅法。

【請求項27】 プライマーが2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である請求項26記載の核酸增幅法。

【請求項28】 加熱および冷却を繰り返す請求項26記載の核酸增幅法。

【請求項29】 請求項1~25項のいずれか1項記載の核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物、2価イオン、1価イオン、プライマー、dNTPおよび緩衝液を含む核酸增幅用試薬。

【請求項30】 請求項1~25項のいずれか1項記載の核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオン、1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTP、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む核酸增幅用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物および該組成物を含む核酸增幅用試薬および該試薬を用いる核酸增幅法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の核酸を増幅する技術に用いる耐熱性DNAポリメラーゼに関する研究が多くなされている。PCR反応に用いられる耐熱性DNAポリメラーゼは、主としてサーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)由来のDNAポリメラーゼ(Tthポリメラーゼ)やサーマス・アクアチカス(*Thermus aquaticus*)由来のDNAポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ)などが用いられてきた。また、超好熱始原菌由来のDNAポリメラーゼ、たとえばバイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(Pfuポリメラーゼ、WO92/09689、特開平5-328969公報)、サーマス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(Tliポリメラーゼ、特開平6-7160号公報)などが知られている。

【0003】本発明者らは熱安定性やDNA合成速度に優れたバイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD1由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(KODポリメラーゼ、特開平7-298879号公報)を見い出した。さらに、本発明者らはバイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD1由来のポリメラーゼのDNAの合成速度や熱安定性を保持したまま、改変前の該酵素に比べて3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を少なくとも5%以下に低下させた改変酵素を作り出すことに成功した。該酵素は、DNA合成速度が少なくとも30塩基/秒であって、pH 8.8 (25°Cでの測定値、95°CにてpHを測定することは困難である)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる耐熱性DNAポリメラーゼであって、改変前の酵素に比べて、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が少なくとも5%以下に低下した酵素である。該酵素を用いることにより、改変前の酵素を用いるよりも増幅効率が上昇することも見い出した。

【0004】一方、長鎖核酸を増幅する方法の1つとして、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠くTaqポリメラーゼ(KlenTaq-278)と3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するPfuポリメラーゼまたはTliポリメラーゼまたはこれらの変異酵素を混合したDNAポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報告されている(Barns, W.M. (1994) Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2216-2220)。また、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示さないTthポリメラーゼと3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示すPfuポリメラーゼまたはTliポリメラーゼ、サーモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼを混合したポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報

告されている(特開平8-38198号公報)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの組成物は1種類のDNAポリメラーゼを用いる場合に比べて、増幅効率は改善されるものの、熱安定性やDNA合成速度の異なる2種類のDNAポリメラーゼを用いており、決して充分な増幅効率とはいえず、より増幅効率が優れた方法が待ち望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは鋭意検討した結果、核酸増幅用のDNAポリメラーゼ組成物であって、第1DNAポリメラーゼと、ポリメラーゼ活性単位で測定すると第1DNAポリメラーゼよりも少量の第2DNAポリメラーゼの組み合わせからなり、熱安定性およびDNA合成速度がほぼ等しいDNAポリメラーゼ、具体的には前記第1DNAポリメラーゼが天然に存在する該酵素に比べて、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が0~5%である改変された耐熱性DNAポリメラーゼであり、そして前記第2DNAポリメラーゼが天然に存在する3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、または天然に存在する該酵素に比べて、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が100~6%である改変されたDNAポリメラーゼよりなる群から選択されるDNAポリメラーゼであるDNAポリメラーゼ組成物を用いることにより、増幅効率の優れたPCRが行えることを見い出し、本発明に到達した。

【0007】すなわち、本発明は改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0~5%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第1DNAポリメラーゼ)および3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100~6%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第2DNAポリメラーゼ)を含み、第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼが、少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物である。

【0008】また、本発明はDNAを錠型とし、プライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅法である。

【0009】さらに、本発明は1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物、2価イオン、1価イオンおよび緩衝液を含む核酸

増幅用試薬である。

【0010】

【発明の実施態様】

【0011】本発明の第1DNAポリメラーゼは、改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0~5%、好ましくは1%以下に低下した3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素である。

【0012】このような第1DNAポリメラーゼとしては、アミノ酸配列が配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する酵素がある。その一例としては、配列番号2の141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の141番目のアスパラギン酸と143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した酵素、配列番号2の311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した酵素などがあげられる。また、配列番号142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した酵素も含まれる。

【0013】本発明の第1DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用: DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【0014】本発明の第1DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用: DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約75℃

分子量: 88~90 KDa

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0015】本発明の第1DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNA A

ポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

【0016】本発明の第2 DNAポリメラーゼは、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである。このような第2 DNAポリメラーゼとしては、アミノ酸配列が配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する酵素または配列番号2に記載のアミノ酸配列の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する酵素がある。その一例としては、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列、または第144番目のスレオニンをバリンに置換した酵素などがあげられる。

【0017】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

【0018】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' -

5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソI (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、X<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、EX<sub>3</sub>、モチーフのうち、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub> およびX<sub>3</sub> の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

なお、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性をもつDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中には、このエキソヌクレアーゼに関して高度に保存されたアミノ酸領域が知られている (EXO I, EXO II, EXO III, 図4)。エキソI (EXO I) 領域にはX<sub>1</sub>、DX<sub>2</sub>、EX<sub>3</sub>、モチーフが存在し、これらのアミノ酸、D (アスパラギン酸) とE (グルタミン酸) はエキソヌクレアーゼ活性に必須であることが知られている。

【0019】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0020】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90 kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、またはリジンに置換したアミノ酸配列、または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【0021】第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼのDNA合成速度は少なくとも30塩基/

秒、好ましくは100～120塩基/秒であって、pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の活性を保持できる耐熱性DNAポリメラーゼである。本発明の第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼは、KODポリメラーゼまたは該酵素の変異体であることが好ましい。

【0022】本発明では、第2DNAポリメラーゼの活性が、第1DNAポリメラーゼの活性よりも小さいことが好ましく、第1DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位であることが好ましい。

【0023】これらの改変された酵素を製造する方法としては、例えば天然型KODポリメラーゼをコードする遺伝子に変異を導入して、蛋白工学的手法により、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する方法がある。

【0024】変異を導入するためのKODポリメラーゼをコードする遺伝子は特に限定されないが、本発明の一実施態様は、パイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD由来の配列リスト・配列番号3に記載の遺伝子を用いた。

【0025】本発明の別な実施態様は、配列番号1に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子に変異を導入して、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する。

【0026】天然型KODポリメラーゼ遺伝子に変異を導入する方法は、既知のいかなる方法でも用いることができる。例えば天然型KODポリメラーゼ遺伝子DNAと変異源となる薬剤を接触させる方法や紫外線照射による方法などから、蛋白工学的な手法、例えばPCR法や部位特異的変異などの方法を用いることができる。また、遺伝子修復機構が欠損されたため、高頻度に遺伝子に変異が起る大腸菌を用いた *in vivo*での変異の導入も可能である。本発明で使用したカメリオン site-directed mutagenesisキット(ストラタジーン社製)とは、(1)目的とする遺伝子を挿入したプラスミドを変性させ、該プラスミドに変異プライマーと選択プライマーとアニーリングさせる。(2)次にDNAポリメラーゼでDNA合成を行った後、ライゲースにてライゲーション反応を行う。(3)選択プライマー中に存在しないが、鋳型となるプラスミドに存在する制限酵素でプラスミドを切断し、変異の挿入されていないDNAを切断する。(4)次に残されたプラスミドで大腸菌を形質転換する。(5)形質転換体から変異プラスミドを調製し、(3),(4)を繰り返し、目的とする変異の挿入されたプラスミドを得る方法である。

【0027】上記のようにして得られた改変ポリメラーゼ遺伝子を、例えばpLED-M1、pBluescript IPTなどベクターに挿入し、例えば大腸菌に形質転

換した後、アンピシリン等の薬剤を含む寒天培地に塗布し、コロニーを形成させる。コロニーを栄養培地、例えばLB培地や2YT培地に接種し、37°Cで12～20時間培養した後、菌体を破碎して粗酵素液を抽出する。菌体を破碎する方法は、公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば超音波処理やガラスビール破碎のような物理的破碎法やリゾチームのような溶菌酵素を用いることができる。この粗酵素を熱処理、例えば80°C、30分間処理し、宿主由来のポリメラーゼを失活させ、DNAポリメラーゼ活性を測定する。次に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定し、両者の活性比率を天然型KODポリメラーゼを比較することにより、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の低下した酵素をスクリーニングすることができる。

【0028】上記方法により選抜された菌株から精製DNAポリメラーゼを取得する方法は、公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば下記方法がある。栄養培地に培養して得られた菌体を回収した後、酵素的または物理的破碎法により破碎抽出して粗酵素液を得る。得られた粗酵素抽出液から熱処理、例えば80°C、30分間処理し、その後、硫酸沈殿によりKODポリメラーゼ画分を回収する。この粗酵素液をセファデックスG-25(ファルマシア・バイオテク)ゲル濾過等の方法により脱塩を行うことができる。この操作の後、Qセファロース、ヘパリンセファロースなどのカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。この精製酵素標品はSDS-PAGEによってほぼ単一のバンドを示す程度に純化される。

【0029】本発明において、DNA合成活性とは鋳型DNAにアニールされたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にデオキシリボヌクレオシド5'-トリホスフェートのα-ホスフェートを共有結合せしめることにより、デオキシリボ核酸にデオキシリボヌクレオシド5'-モノホスフェートを鋳型依存的に導入する反応を触媒する活性をいう。

【0030】その活性測定法は、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行う。本発明では、下記A液25μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5μlを加えて75°Cで10分間反応する。その後、氷冷し、E液50μl、D液100μlを加えて、攪拌後、さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター(ワットマンGF/Cフィルター)で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、鋳型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定する。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とする。

13

A :	4.0 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	1.6 mM	塩化マグネシウム
	1.5 mM	ジチオスレイトール
	100 µg/ml	BSA
B :	2 µg/µl	活性化仔牛胸腺DNA
C :	1.5 mM	dNTP (250 cpm/pmol [ <sup>3</sup> H] dTTP)
D :	20%	トリクロロ酢酸 (2 mM ピロリン酸ナトリウム)
E :	1 µg/µl	キャリアーDNA

【0031】本発明において、3'-5'エキソヌクレ

アーゼ活性とは、DNAの3'末端領域を切除し、5'一モノヌクレオチドを遊離する活性をいう。その活性測定法は、50 µlの反応液 (120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5 µg トリチウムラベルされた大腸菌DNA) を1.5 mlのエッペンチューブに分注し、DNAポリメラーゼを加える。75°Cで10分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして、0.1%のBSAを50 µl加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100 µl加え混合する。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離する。上清100 µlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定する。

【0032】本発明において、DNA合成速度とは、単位時間当たりのDNAの合成数をいう。その測定法はDNAポリメラーゼの反応液(20mM Tris-HCl(pH7.5), 8mM 塩化マグネシウム、7.5mM ジチオスレイトール、100 µg/ml BSA, 0.1mM dNTP, 0.2 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP)を、プライマーをアニーリングさせたM13mp18一本鎖DNAと75°Cで反応させる。反応停止は等量の反応停止液 (50mM 水酸化ナトリウム、10mM EDTA, 5% フィコール、0.05% プロモフェノールブルー) を加えることにより行う。上記反応にて合成されたDNAをアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行う。DNAサイズマーカーとしてはラベルしたλ/HindIIIを用いる。このマーカーのバンドを指標として合成されたDNAのサイズを測定することによって、DNA合成速度を求める。

【0033】本発明において、熱安定性とは、pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理での残存活性を意味する。

【0034】本発明の改変前の耐熱性DNAポリメラーゼは、鹿児島県子宝島にて単離した超好熱始菌の1種であるバイロコッカス(Pyrococcus) sp. KOD由来の酵素である。該酵素を生産するKODの菌学的性質は、特開平7-298879号公報に記載される。該酵素は上記菌株を培養して生産される。該酵素は下記理化学的性質を有する。

作用: DNA合成活性を有し、3'-5'エキソヌクレ

14

アーゼ活性を有する。

10 DNA合成速度: 少なくとも120塩基/秒  
熱安定性: pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約75°C

分子量: 88~90 kDa

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列

【0035】本発明の核酸增幅法では、上記DNAポリメラーゼ組成物を使用して、DNAを錆型とし、プライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成する方法である。

【0036】本発明の核酸增幅法の1種であるPCR法では、まず、試料中の核酸、特に長鎖核酸が2本鎖である場合には熱により変性させ、1本鎖とする。長鎖核酸が不完全な鎖分離をすれば、プライマーのアニーリングおよび伸長反応を妨げるであろう。次いで該1本鎖を錆型として該錆型に相補的なプライマー、好ましくは1方が他方のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーおよびdNTPを本発明のDNAポリメラーゼ組成物を用いてPCR反応液中に反応させる。

【0037】反応温度は、2段階の温度サイクルを使用し、増幅される核酸が変性される高温と変性された核酸にプライマーがアニールしてプライマー伸長が起こる低温とを交互に繰り返す。通常、94°Cで0.5~1分間に→68°Cで0.5~10分間に2.5~4.0回繰り返す。2つのプライマーは錆型核酸配列の反対の末端にアニールし、そして各プライマーの伸長生成物が錆型核酸配列の相補的なコピーであり、かつ、その相補体から分離された時に他方のプライマーにハイブリダイズすることができるような方向で錆型核酸にアニールする。反応時間は、伸長反応が鎖の合成を完結するに十分な時間であることが好ましい。20 kbより長い核酸の増幅には、少なくとも10~20分間のアニーリングおよび伸長時間が好ましい。

【0038】長鎖核酸は増幅の間に分解に対して保護されることが好ましく、例えばグリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)などを使用する。

【0039】誤って取り込まれたヌクレオチドの存在は、鎖の合成を早々と終わらせ、次の回の増幅に向かう錆型鎖の数を減少させ、長鎖核酸の増幅効率を低下させ

50

ています。しかしながら、本発明ではDNAポリメラーゼ活性に加えて、反応液中に少量の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が存在することにより、プライマー伸長生成物の合成の間に誤った取込まれたヌクレオチドを除去し、なお、優勢的なポリメラーゼ活性により完全な鎖合成を可能とする。

【0040】反応緩衝液のpHと組成、塩（2価イオンおよび1価イオン）ならびにプライマーの設計は、長鎖核酸の増幅効率にとって重要である。PCR試薬の調製は、通常、変性段階前の室温で行うから、別なプライマーや一部の相同的な核酸配列へのプライマーの結合を引き起こすことがある。この非特異的なプライマーの結合からも伸長生成物が形成されると、長鎖生成物の増幅効率を減少させることになる。このような特異的結合を防ぐためには、高温になってから、酵素を添加するなどのいわゆるホットスタート法が好ましい。

【0041】本発明のDNAポリメラーゼは、その活性を維持するために、2価イオン、例えばマグネシウムイオンおよび1価イオン、例えばアンモニウムイオンおよび／またはカリウムイオンを共存させることが好ましい。また、核酸増幅用反応液には、緩衝液およびこれらのイオンを含むとともに、BSA、非イオン界面活性剤、例えばTriton X-100および緩衝液が存在していてもよい。

【0042】本発明の核酸増幅用試薬は、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンおよび／またはカリウムイオン、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む。本発明では、第2DNAポリメラーゼの活性は、第1DNAポリメラーゼの活性よりも小さいことが好ましく、第1DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位であることが好ましい。本発明の試薬には必要により、補助溶解剤、例えばグリセリン、DMSO、ポリエチレングリコールなどを含んでいてよい。

【0043】緩衝液としては、Tris緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（トリシン緩衝液）、N-ビス（ヒドロキシエチル）グリシン（バイシン緩衝液）などが使用される。最適の緩衝液およびpHは使用するDNAポリメラーゼに依存する。本発明ではKODポリメラーゼおよび該酵素の変異体を使用する場合は、pH7.5～9.2（25°Cにおいて、10mM～50mM、好ましくは20～120mMである。2価カチオンはマグネシウムイオンが好ましく、塩化マグネシウムなどが使用される。その濃度は1～2mMであることが好ましい。1価カチオンはアンモニウムイオンまたはカリウムイオンが好ましく、硫酸アンモニウム、グルタミン酸カリウム、酢酸カリウムなどが使用される。

それらの濃度は2～50mMであることが好ましい。プライマーは2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーであることが好ましい。その濃度は、0.2～1μMであることが好ましい。

【0044】次に、実施例を用いて本発明を詳細に説明する。

#### 参考例1

##### 超好熱始原菌KOD由来のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

鹿児島県子宝島にて単離した超好熱始原菌KOD1株を95°Cにて培養後、菌体を回収した。得られた菌体から常法に従い、超好熱始原菌KOD株の染色体DNAを調製した。バイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来のDNAポリメラーゼ(*Pfu*ポリメラーゼ)の保存領域アミノ酸配列に基づき、2種のプライマー(5'-GGATTAGTATAGTCCAATGGSSGGCA-3' および5'-GAGGGCAGAAGTTTATTCGGAGCTT-3')を合成した。この2種のプライマーを使用し、調製したDNAを鋳型として、PCR反応を行った。

【0045】PCR増幅DNA断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を決定した後、この増幅DNA断片をプローブとして、KOD1株染色体DNA制限酵素処理産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、DNAポリメラーゼをコードする断片のサイズを求めた（約4～7Kbp）。さらに、この大きさのDNA断片をアガロースゲルから回収し、プラスミドpBS（ストラタジーン社製）に挿入し、これらの混合物より大腸菌(*E.coli* JM109)を形質転換して、ライブラーを作製した。サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い、上記ライブラーから、KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有すると考えられるクローン株(*E.coli* JM109/pSBKOD1)を取得した。

【0046】取得したクローン株、(*E.coli* JM109/pSBKOD1)よりプラスミド、pSBKOD1を回収し、常法に従い、塩基配列を決定した。さらに求められた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子は5010塩基からなり、1670個のアミノ酸がコードされていた（配列番号1）。

【0047】完全なポリメラーゼ遺伝子を作成するため、2箇所の介在配列（1374～2453bp: 2708～4316bp）をPCR融合法により取り除いた。PCR融合法では、クローン株より回収したプラスミドを鋳型に、3組のプライマーを組み合わせて、各々PCRを行い、介在配列を除いた3断片を増幅した。この際、PCRに用いるプライマーは、他の断片と結合する側に結合相手と同様な配列がくるように設計した。また、両端には別々な制限酵素サイト（N末端側：EcoRV、C末端側：BamHI）が創出されるように設計

した。次いで、PCR增幅断片中、構造上中央に位置する断片と、N末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。また、同様に構造上、中央に位置する断片と、C末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。このようにして得られた2種の断片を用いて再度PCRを行い、介在配列が取り除かれ、N末端にEcoRV、C末端にBamHIサイトを有するKOD1株由来のDNAポリメラーゼをコードする完全な形の遺伝子断片を取得した。更に、同遺伝子をT7プロモーターで誘導可能な発現ベクター、pET-8cのNcoI/BamHIサイト、先に創出した制限酵素サイトを利用し、サブクローニングして、組換え発現ベクター（pET-p01）を得た。なお、E. coli BL21 (DE3) / pET-p01は、生命工学工業研究所へ寄託されている（FERM BP-5513）。

#### 【0048】参考例2

KODポリメラーゼ遺伝子のサブクローニング  
耐熱性DNAポリメラーゼを改変するために、プラスミドpET-p01からKODポリメラーゼ遺伝子を切り出し、pBluecriptにサブクローニングした。すなわちpET-p01を制限酵素、XbaIとBamHI（東洋紡製）で切断し、約2.3kbのKODポリメラーゼ遺伝子を切り出した。次にこのDNA断片をライゲーションキット（東洋紡製 Ligation high）を用いて、XbaIとBamHIで切断したプラスミドpBluecript SK（-）と連結した。次に、市販のコンビテントセル（東洋紡製 competent high JM109）を用いて形質転換を行った。100μg/mlのアンビシリンを含んだLB寒天培地（1%バクトリブトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天、ギブコ社製）で35℃で16時間培養し、得られたコロニーからプラスミドを調製した。さらに、部分塩基配列を確認してKODポリメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpKOD1を得た。

#### 【0049】参考例3

改変型遺伝子（DA）の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

##### （試薬）

A :	40 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	16 mM	塩化マグネシウム
	15 mM	ジチオスレイトール
	100 μg/ml	BSA
B :	2 μg/μl	活性化仔牛胸腺DNA
C :	1.5 mM	dNTP (250 cpm/pmol [ <sup>3</sup> H] dTTP)
D :	20%	トリクロロ酢酸 (2 mMピロリン酸ナトリウム)
E :	1 μg/μl	キャリアーDNA

【0052】（方法）A液25μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5μlを加えて75℃で10分間反応する。その後、氷冷し、E液50μl

##### \* リメラーゼ（DA）の精製

参考例2で得られたプラスミドpKOD1を用いて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODDA）。作製はカメレオン site-directed mutagenesisキット（ストラタジーン社製）を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号7に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読を行った。得られたプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、JM109（pKODDA）を得た。

【0050】滅菌処理した100μg/mlのアンビシリンを含んだTB培地（Molecular Cloning, p. A. 2に記載）6Lを10Lジャーファーメンターに分注した。この培地に予め100μg/mlのアンビシリンを含んだ50mlのLB培地（1%バクトリブトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、ギブコ社製）で30℃、16時間培養した大腸菌JM109（pKODDA）（500ml坂口フ拉斯コ使用）を接種し、35℃で12時間通気攪拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400mlの破碎緩衝液（10mM Tris-HCl (pH 8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA）に懸濁後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を85℃にて30分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンイミンを用いた除核酸処理、硫安分画、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液（50mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1%ノニデットP40, 50%グリセリン）に置換し、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DA）を得た。上記精製工程のDNAポリメラーゼ活性測定は以下の操作で行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

##### 【0051】

1、D液100μlを加えて、攪拌後、さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター（ワットマンGF/Cフィルター）で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーション

19

カウンター（パッカード社製）で計測し、錆型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定した。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0053】参考例4

変異体（EA）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODEA）。選択プライマーとしては配列番号5に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号8に記載のプライマーを用いた。更に参考例3同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（EA）を得た。

【0054】参考例5

変異体（DEA）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて配列表2に記載のKODポリメラーゼの141番目のアスパラギン酸及び143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODDEA）。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号6に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DEA）を得た。

【0055】参考例6

変異体（ND）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKOND）。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号9に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（ND）を得た。

【0056】参考例7

変異体（YF）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて配列表2に記載のKODポリメラーゼの311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODYF）。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号10に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（YF）を得た。

【0057】参考例8

20

改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DA、EA、DEA、NDおよびYF）のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ（東洋紡製）を用いた。50μlの反応液（120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA）を1.5mlのエッペンチューブに分注し、DNAポリメラーゼをそれぞれ25単位、50単位、100単位加えた。なお、天然型のKODポリメラーゼは0.25単位、0.5単位、1単位用いた。75°Cで10分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして、0.1%のBSAを50μl加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ビロリン酸ナトリウム溶液を100μl加え混合した。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清100μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカード社製）で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定した。図1に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNAの分解率を示した。この結果では改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DEA、DA、EA）の3種類のポリメラーゼはエキソヌクレアーゼ活性が検出できなかった。また、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（ND）は天然型のKODポリメラーゼの約0.1%、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（YF）は約0.01%のエキソヌクレアーゼ活性を示した。

【0058】参考例9

熱安定性の確認

参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DA、EA、DEA、NDおよびYF）の熱安定性を以下の方法にて測定した。精製した改変型DNAポリメラーゼ5単位を100μlの緩衝液（20mM Tris-HCl pH8.8 at 25°C, 10mM 塩化カリウム, 10mM 硫酸アンモニウム, 2mM 硫酸マグネシウム, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/ml BSA, 5mM 2-メルカプトエタノール）に混合し、95°Cでブレインキュベートとした。この混合液から経時に試料を採取し、参考例3記載の方法にてポリメラーゼ活性を測定した。比較として、Taqポリメラーゼ（東洋紡製）および天然型KODポリメラーゼ（東洋紡製）も同様の操作を行った。図2に示したように、いずれの改変型耐熱性DNAポリメラーゼも天然型KODポリメラーゼと同様に、95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を示した。それに対してTaqポリメラーゼは15%以下の残存活性であった。

【0059】参考例10

DNA合成速度測定

参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラ-

21

ゼ (DA, EA, DEA, ND および YF) の DNA 合成速度を以下の方法で測定した。精製した改変型 DNA ポリメラーゼ 1 単位を  $10 \mu\text{l}$  の反応液 (20mM Tris-HCl (pH7.5), 8mM 塩化マグネシウム, 7.5mM ジチオスレイトール, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA, 0.1mM dNTP, 0.2  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP) で  $0.2 \mu\text{g}$  の配列番号 15 のプライマーをアニーリングさせた M13mp18 1 本鎖 DNA と 75  $^{\circ}\text{C}$  で 20 秒、40 秒、60 秒間反応させた。反応停止は等量の反応停止液 (50mM 水酸化ナトリウム, 10mM EDTA, 5% フィコール, 0.05% プロモフェノールブルー) を加えることにより行った。比較として Taq ポリメラーゼ (東洋紡製) および天然型の KOD ポリメラーゼ (東洋紡製) も同様の操作を行った。

【0060】上記反応にて合成された DNA をアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行った。DNA サイズマークーとしてはラベルした  $\lambda$ -HindIII を用いた。このマークーのバンドを指標として合成された DNA のサイズを測定することによって、DNA 合成速度を求めた。その結果、いずれの改変型ポリメラーゼも天然型の KOD ポリメラーゼと同様に、約 120 塩基/秒の合成速度を有していた。それに対して Taq ポリメラーゼは約 60 塩基/秒の合成速度であった。

#### 【0061】参考例 11

##### 改変型遺伝子 (IN) の作製および改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

参考例 2 で得られたプラスミド pKOD1 を用いて、KOD ポリメラーゼの EXO1 領域に存在する  $X_1$ ,  $DX$ ,  $EX$ , モチーフのうち、 $X_2$  のイソロイシンをアスパラギンに置換した改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子をもつプラスミドを作製した (pKODIN)。作製は\*

(試薬)

A :	40 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	16 mM	塩化マグネシウム
	15 mM	ジチオスレイトール
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	BSA
B :	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	活性化仔牛胸腺 DNA
C :	1.5 mM	dNTP (250 cpm/pmol [ $^3\text{H}$ ] dTTP)
D :	20%	トリクロロ酢酸 (2 mM ピロリン酸ナトリウム)
E :	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	キャリアー DNA

【0064】(方法) A 液  $25 \mu\text{l}$ 、B 液および C 液各  $5 \mu\text{l}$  および滅菌水  $10 \mu\text{l}$  をエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合後、上記熱処理液  $5 \mu\text{l}$  を加えて 75  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応する。その後、水冷し、E 液  $50 \mu\text{l}$ 、D 液  $100 \mu\text{l}$  を加えて、攪拌後さらに 10 分間水冷する。この液をガラスフィルター (ワットマン GF/C フィルター) で濾過し、D 液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター (パッカード社製) で計測し、鉄型 DNA へのヌクレオチドの取り込みを測定した酵素活性の 1 単位は

50

22

\* カメレオン site-directed mutagenesis キット (ストラタジーン社製) を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号 14 に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号 15 に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読で行った。得られたプラスミドで大腸菌 JM109 を形質転換し、JM109 (pKODIN) を得た。【0062】滅菌処理した  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンビシリンを含んだ TB 培地 (Molecular Cloning, p. A. 2 に記載) 6 L を  $10 \text{ L}$  ジャーファーメンターに分注した。この培地に予め  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンビシリンを含んだ  $50 \text{ ml}$  の LB 培地 (1% バクトリブト、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、ギブコ社製) で  $30^{\circ}\text{C}$ 、16 時間培養した大腸菌 JM109 (pKODIN) ( $500 \text{ ml}$  坂口フラスコ 使用) を接種し、 $35^{\circ}\text{C}$  で 12 時間通気攪拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、 $400 \text{ ml}$  の破碎緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA) に懸濁後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を  $85^{\circ}\text{C}$  にて 30 分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンイミンを用いた除核酸処理、硫安分画、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1% ノニデット P40, 50% グリセリン) に置換し、改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (IN) を得た。上記精製工程の DNA ポリメラーゼ活性測定は以下の操作で行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

#### 【0063】

この条件下で 30 分あたり  $10 \text{ n}$  モルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

#### 【0065】参考例 12

##### 変異体 (IE) 遺伝子の作製および改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

参考例 11 と同様の方法にて、KOD ポリメラーゼの EXO1 領域に存在する  $X_1$ ,  $DX$ ,  $EX$ , モチーフのうち、 $X_2$  のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKODIE)。選択プライマーとしては配列番号 14 に記載の

イマーを使用した。変異プライマーは配列番号16に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(I E)を得た。

#### 【0066】参考例13

##### 変異体(I Q)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX<sub>1</sub> DX<sub>2</sub> EX<sub>3</sub>モチーフのうち、X<sub>2</sub>のイソロイシンをグルタミンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD I Q)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号17に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(I Q)を得た。

#### 【0067】参考例14

##### 変異体(I D)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX<sub>1</sub> DX<sub>2</sub> EX<sub>3</sub>モチーフのうち、X<sub>2</sub>のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD I D)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号18に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(I D)を得た。

#### 【0068】参考例15

##### 変異体(T V)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX<sub>1</sub> DX<sub>2</sub> EX<sub>3</sub>モチーフのうち、X<sub>3</sub>のチロシンをバリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD T V)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号19に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(T V)を得た。

#### 【0069】参考例16

##### 変異体(I K)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX<sub>1</sub> DX<sub>2</sub> EX<sub>3</sub>モチーフのXのうち、X<sub>2</sub>のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD I K)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号21に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(I K)を得た。

#### 【0070】参考例17

##### 変異体(I R)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX<sub>1</sub> DX<sub>2</sub> EX<sub>3</sub>モチーフのXのうち、X<sub>2</sub>のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD I R)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号20に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(I R)を得た。

#### 【0071】参考例18

##### 改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記参考例11～17で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(I N、I E、I Q、I D、Y V、I KおよびI R)のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ(東洋紡製)を用いた。50 μlの反応液(120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5 μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA)を1.5 mlのエッペンチューブに分注し、上記DNAポリメラーゼをそれぞれ0.5ユニット、1ユニット、1.5ユニット加えて、75°Cで10分間反応させた。氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして0.1%のBSAを50 ml加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100 μl加え混合した。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清100 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定した。

【0072】図5に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNAの分解率を示した。更に天然型のKODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比を図6に示した。このように本発明によれば様々な強さの3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼが得られることを示した。天然型のKODポリメラーゼの3'～5'エキソヌクレアーゼ活性に対して、I Nは約9.5%、I Eは約7.6%、I Qは約6.4%、I Dは約5.2%、T Vは約4.8%、I Kは約3.0%、I Rは約0%の同活性を有していた。

#### 【0073】参考例19

##### 改変型DNAポリメラーゼのPCRでのDNA合成の正確性の測定

天然型のKODポリメラーゼ、改変型耐熱性DNAポリメラーゼI E、I D、I K、I RおよびTaqポリメラーゼについて、PCRでのDNA合成の正確性を以下の方法にて測定した。プラスミドpUR288 (Current

Protocols in Molecular Biology 1.5.6に記載)を制限酵素Sca Iで切断した。このプラスミドを1ng用いてPCRを行った。反応終了後、5μlの反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、約5.3kbのターゲットの増幅を確認した。残りの反応液をフェノール/クロロホルム処理し、次にエタノール沈殿を行った。沈殿を乾燥後50μlのHig hバッファー(50mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT)に溶解した。さらに制限酵素Sca I(東洋紡製)を10ユニット加えて、37°Cで16時間反応させた。アガロースゲル電気泳動にて目的の増幅産物を分離し、その部分のアガロースを切り出した。このアガロースからジーンクリーン2(BIO101社製)を用いてDNAを精製した。精製したDNA 10ngを10μlになるようにTEバッファー(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)で希釈し、ライゲーションキット(東洋紡製 Ligation h i g h)の反応液10μlを加えて16°Cで30分間反応した。次に市販のコンピーテントセル(東洋紡製 competent high JM109)を用いて形質転換を行った。\*

	KOD	IE	ID	IK	IR	rTaq
全コロニー	2394	3267	4869	2826	1197	2831
変異コロニー	19	63	148	362	299	795
変異率(%)	0.79	1.9	3.0	12.8	25.0	28.1

【0076】表1から明らかなように、本発明で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼIE、ID、IK、IRは、天然型のKODポリメラーゼには劣るもの、Taqポリメラーゼより変異率が低く、すなわちDNA合成の正確性が高かった。

#### 【0077】実施例1

DNAポリメラーゼ組成物を用いたPCR(ヒトゲノム)  
改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA、EA、DEA、ND、YF)と天然型KODポリメラーゼの混合物を用いてPCRを行った。50mMの反応液(120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM硫酸アンモニウム、1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 30ngのヒト胎盤由来のゲノムDNA(クローンテック社製)、10ピコモルの配列表11、12記載のプライマー)にNDを2.5単位、KODポリメラーゼを0.05単位加えてPCR反応を行った。サーマルサイクルはパーキンエルマー社製のモデルP J 2000を用いた。また反応条件は94°C、30秒→68°C、3分を30サイクル行った。比較として改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(ND)、Taqポリメラーゼ(東洋紡製)、市販のDNAポリメラーゼ混合物(E x Taq)(宝酒造社製)およびアドバンテージT th(クローンテック社製)も同様にして、PCR反応を行った。ただし、反応液組成は市販品に添付されている緩衝液を用い、ゲノムDNA及びプライマーは全て上記と同量用いた。反応終了後、5μlの反応液についてアガロースゲ

ル電気泳動を行い、約4kbのターゲットの増幅を確認した。図3にアガロースゲル電気泳動の結果を示した。この結果、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(ND)と天然型KODポリメラーゼの混合物を用いて、PCRを行った場合、市販のポリメラーゼ混合物に比べて良好な増幅であった。

#### 【0075】

#### 【表1】

ル電気泳動を行い、約4kbのターゲットの増幅を確認した。図3にアガロースゲル電気泳動の結果を示した。この結果、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(ND)と天然型KODポリメラーゼの混合物を用いて、PCRを行った場合、市販のポリメラーゼ混合物に比べて良好な増幅であった。

#### 【0078】

【発明の効果】本発明では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方を使用することにより、増幅可能な錆型核酸の長さを大きく増大させることができる。また、熱安定性やDNA合成速度がほぼ同じであって、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のみが異なる2種以上のDNAポリメラーゼの混合物を用いることにより、増幅効率の優れた核酸増幅を行うことができる。

#### 【0079】

#### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 5342

配列の型: 核酸(DNA)

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: 超好熱始原菌

株名: KOD 1

配列の特徴

50 156-5165 P CDS

27

1374-2453 介在配列

配列

CCTTGAGGGC CTGGGGTTAT GGGACGTTCC AGTTTGGGCC TACTCAAAGA TGCCGGTTT 60  
 ATAACCGAGA AAAATGGGA CCTATTACGA TCTCTCCCTG ATGTGGGGTT TACAATAAG 120  
 CCTGGATTGT TCTACAAGAT TATGGGGAT GAAAG ATG ATC CTC GAC ACT GAC 173

Met Ile Leu Asp Thr Asp

1 5

TAC ATA ACC GAG GAT CGA AAG CCT GTC ATA AGA ATT TTC AAG AAG GAA 221  
 Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile Arg Ile Phe Lys Lys Glu  
 10 15 20

AAC CCC GAG TTT AAG ATT GAG TAC GAC CGG ACT TTT GAA CCC TAC TTC 269  
 Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Thr Phe Glu Pro Tyr Phe  
 25 30 35

TAC GCC CTC CTG AAG GAC GAT TCT GCC ATT GAG GAA GTC AAG AAG ATA 317  
 Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile Glu Glu Val Lys Ile  
 40 45 50

ACC CCC GAG AGG CAC CGG ACG GTT GTC ACG GTT AAG CGG GTT GAA AAG 365  
 Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr Val Lys Arg Val Glu Lys  
 55 60 65 70

GTT CAG AAG AAG TTC CTC CGG AGA CCA GTT GAG GTC TGG AAA CTC TAC 413  
 Val Glu Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Trp Lys Leu Tyr  
 75 80 85

TTT ACT CAT CCG CAG GAC GTC CCA CGG ATA AGG GAC AAG ATA CGA GAG 461  
 Phe Thr His Pro Glu Asp Val Pro Ala Ile Arg Asp Lys Ile Arg Glu  
 90 95 100

CAT CGA CGA GTT ATT GAC ATC TAC GAG TAC GAC ATA CCC TTC CGC AAG 509  
 His Gly Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys  
 105 110 115

CGC TAC CTC ATA GAC AAG GGA TTA GTG CCA ATG GAA CGC GAC GAG GAG 557  
 Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu  
 120 125 130

CTG AAA ATG CTC GCC TTC GAC ATT GAA ACT CTC TAC CAT GAG CGC GAG 605  
 Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu  
 135 140 145 150

GAG TTC GCC GAG GGG CCA ATC CTT ATG ATA AGC TAC GCC GAC GAG GAA 653  
 Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu  
 155 160 165

GGG GCC AGG GTG ATA ACT TGG AAG AAC GTG GAT CTC CCC TAC GTT GAC 701  
 Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val Asp Leu Pro Tyr Val Asp  
 170 175 180

GTC GTC TCG ACG GAG AGG GAG ATG ATA AAG CGC TTC CTC CGT GTT GTG 749  
 Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Arg Val Val  
 185 190 195

AAG GAG AAA GAC CGG GAC GTT CTC ATA ACC TAC AAC CGC GAC AAC TTC 797  
 Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe  
 200 205 210

GAC TTC GCC TAT CTG AAA AAG CGC TGT GAA AAG CTC CGA ATA AAC TTC 845  
 Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Arg Cys Glu Lys Leu Gly Ile Asn Phe  
 215 220 225 230

CCC CTC CGA AGG GAT CGA ACC GAG CGG AAG ATT CAG AGG ATG CGC GAC 893

28

\* \* 2708-4316 介在配列

29

30

Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp  
 235 240 245  
 AGG TTT GCC GTC GAA GTG AAG GGA CGG ATA CAC TTC GAT CTC TAT CCT 941  
 Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro  
 250 255 260  
 GTG ATA AGA CGG ACG ATA AAC CTG CCC ACA TAC ACG CTT GAG GCC GTT 989  
 Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val  
 265 270 275  
 TAT GAA GCC GTC TTC CCG CAG CCG AAG GAG AAG GTT TAC GCT GAG GAA 1037  
 Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu  
 280 285 290  
 ATA ACA CCA GCC TGG GAA ACC CGC GAG AAC CTT GAG AGA GTC GCC CGC 1085  
 Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn Leu Glu Arg Val Ala Arg  
 295 300 305 310  
 TAC TCG ATG GAA GAT CGG AAG GTC ACA TAC GAG CTT GGG AAG GAG TTC 1133  
 Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gly Lys Glu Phe  
 315 320 325  
 CTT CCG ATG GAG GCC CAG CTT TCT CGC TTA ATC GCC CAG TCC CTC TGG 1181  
 Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Ile Gly Gln Ser Leu Trp  
 330 335 340  
 GAC GTC TCC CGC TCC AGC ACT CGC AAC CTC GTT GAG TGG TTC CTC CTC 1229  
 Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu  
 345 350 355  
 AGG AAG GCC TAT GAG AGG AAT GAG CTG GCC CCG AAC AAG CCC GAT GAA 1277  
 Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Asp Glu  
 360 365 370  
 AAG GAG CTG GCC AGA AGA CGG CAG AGC TAT GAA GGA GGC TAT GTC AAA 1325  
 Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys  
 375 380 385 390  
 GAG CCC GAG AGA GGG TTG TGG GAG AAC ATA GTG TAC CTA GAT TTT AGA 1373  
 Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg  
 395 400 405  
 TGG CAT CCA GCC GAT ACG AAG GTT GTC GTC AAG GGG AAG GGG ATT ATA 1421  
 Cys His Pro Ala Asp Thr Lys Val Val Val Lys Gly Lys Gly Ile Ile  
 410 415 420  
 AAC ATC AGC GAG GTT CAG GAA GGT GAC TAT GTC CTT CGG ATT GAC CGC 1469  
 Asn Ile Ser Glu Val Gln Glu Gly Asp Tyr Val Leu Gly Ile Asp Gly  
 425 430 435  
 TGG CAG AGA GTT AGA AAA GTA TGG GAA TAC GAC TAC AAA CGG GAG CTT 1517  
 Trp Gln Arg Val Arg Lys Val Trp Glu Tyr Asp Tyr Tyr Lys Gly Glu Leu  
 440 445 450  
 GTC AAC ATA AAC CGG TTA AAG TGT ACC CCC AAT CAT AAG CTT CCC GTT 1565  
 Val Asn Ile Asn Gly Leu Lys Cys Thr Pro Asn His Lys Leu Pro Val  
 455 460 465 470  
 GTT ACA AAG AAC GAA CGA CAA ACG AGA ATA AGA GAC AGT CTT CCT AAG 1613  
 Val Thr Lys Asn Glu Arg Gln Thr Arg Ile Arg Asp Ser Leu Ala Lys  
 475 480 485  
 TCT TTC CTT ACT AAA AAA GTT AAG CGC AAG ATA ATA ACC ACT CCC CTT 1661  
 Ser Phe Leu Thr Lys Lys Val Lys Gly Lys Ile Ile Thr Thr Pro Leu  
 490 495 500

31

32

TTC TAT GAA ATA GGC AGA GCG ACA AGT GAG AAT ATT CCA GAA GAA GAG 1709  
 Phe Tyr Glu Ile Gly Arg Ala Thr Ser Glu Asn Ile Pro Glu Glu Glu  
 505 510 515  
 GTT CTC AAG GGA GAG CTC GCT GGC ATA CTA TTG GCT GAA GGA ACG CTC 1757  
 Val Leu Lys Gly Glu Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ala Glu Gly Thr Leu  
 520 525 530  
 TTG AGG AAA GAC GTT GAA TAC TTT GAT TCA TCC CCC AAA AAA CCG AGG 1805  
 Leu Arg Lys Asp Val Glu Tyr Phe Asp Ser Ser Arg Lys Lys Arg Arg  
 535 540 545 550  
 ATT TCA CAC CAG TAT CGT GTT GAG ATA ACC ATT GGG AAA GAC GAG GAG 1853  
 Ile Ser His Gln Tyr Arg Val Glu Ile Thr Ile Gly Lys Asp Glu Glu  
 555 560 565  
 GAG TTT AGG GAT CGT ATC ACA TAC ATT TTT GAG CGT TTG TTT GGG ATT 1901  
 Glu Phe Arg Asp Arg Ile Thr Tyr Ile Phe Glu Arg Leu Phe Gly Ile  
 570 575 580  
 ACT CCA AGC ATC TCG GAG AAG AAA GGA ACT AAC GCA GTA ACA CTC AAA 1949  
 Thr Pro Ser Ile Ser Glu Lys Gly Thr Asn Ala Val Thr Leu Lys  
 585 590 595  
 GTT GCG AAG AAG AAT GTT TAT CTT AAA GTC AAG GAA ATT ATG GAC AAC 1997  
 Val Ala Lys Lys Asn Val Tyr Leu Lys Val Lys Glu Ile Met Asp Asn  
 600 605 610  
 ATA GAG TCC CTA CAT GCC CCC TCG GTT CTC AGG GGA TTC TTC GAA GGC 2045  
 Ile Glu Ser Leu His Ala Pro Ser Val Leu Arg Gly Phe Glu Gly  
 615 620 625 630  
 GAC GGT TCA GTA AAC AGG GTT AGG AGG AGT ATT GTT GCA ACC CAG CGT 2093  
 Asp Gly Ser Val Asn Arg Val Arg Arg Ser Ile Val Ala Thr Gln Gly  
 635 640 645  
 ACA AAG AAC GAG TGG AAG ATT AAA CTG GTG TCA AAA CTG CTC TCC CAG 2141  
 Thr Lys Asn Glu Trp Lys Ile Lys Leu Val Ser Lys Leu Leu Ser Gln  
 650 655 660  
 CTT CGT ATC CCT CAT CAA ACG TAC ACG TAT CAG TAT CAG GAA AAT CGG 2189  
 Leu Gly Ile Pro His Gln Thr Tyr Thr Tyr Gln Tyr Glu Asn Gly  
 665 670 675  
 AAA GAT CGG AGC AGG TAT ATA CTG GAG ATA ACT GGA AAG GAC CGA TTG 2237  
 Lys Asp Arg Ser Arg Tyr Ile Leu Glu Ile Thr Gly Lys Asp Gly Leu  
 680 685 690  
 ATA CTG TTC CAA ACA CTC ATT GGA TTC ATC AGT GAA AGA AAG AAC CCT 2285  
 Ile Leu Phe Gln Thr Leu Ile Gly Phe Ile Ser Glu Arg Lys Asn Ala  
 695 700 705 710  
 CTG CTT AAT AAG GCA ATA TCT CAG AGG GAA ATG AAC AAC TTG GAA AAC 2333  
 Leu Leu Asn Lys Ala Ile Ser Gln Arg Glu Met Asn Asn Leu Glu Asn  
 715 720 725  
 AAT GGA TTT TAC AGG CTC AGT GAA TTC AAT GTC ACC ACG GAA TAC TAT 2381  
 Asn Gly Phe Tyr Arg Leu Ser Glu Phe Asn Val Ser Thr Glu Tyr Tyr  
 730 735 740  
 GAG GCC AAG GTC TAT GAC TTA ACT CTT GAA GGA ACT CCC TAC TAC TTT 2429  
 Glu Glu Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe  
 745 750 755  
 GCC AAT GGC ATA TTG ACC CAT AAC TCC CTG TAC CCC TCA ATC ATC ATC 2477  
 Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile

33			34
760	765	770	
ACC CAC AAC GTC TCG CCG GAT ACG CTC AAC AGA GAA GGA TGC AAG GAA			2525
Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu			
775	780	785	790
TAT GAC GTT GCC CCA CAG GTC CGC CAC CGC TTC TCC AAG GAC TTC CCA			2573
Tyr Asp Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro			
795	800	805	
CGA TTT ATC CCG AGC CTG CTT GGA GAC CTC CTA GAG GAG AGG CAG AAG			2621
Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys			
810	815	820	
ATA AAG AAG AAG ATG AAG GCC ACG ATT GAC CCG ATC GAG AGG AAG CTC			2669
Ile Lys Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu			
825	830	835	
CTC GAT TAC AGG CAG AGG GCC ATC AAG ATC CTG GCA AAC AGC ATC CTA			2717
Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Ile Leu			
840	845	850	
CCC GAG GAA TGG CTT CCA GTC CTC GAG GAA CGG GAG GTT CAC TTC GTC			2765
Pro Glu Glu Trp Leu Pro Val Leu Glu Glu Gly Glu Val His Phe Val			
855	860	865	870
AGG ATT CGA GAG CTC ATA GAC CGG ATG ATG GAG GAA AAT GCT CGG AAA			2813
Arg Ile Gly Glu Leu Ile Asp Arg Met Met Glu Glu Asn Ala Gly Lys			
875	880	885	
GTA AAG AGA GAG CGC GAG ACG GAA GTG CTT GAG GTC AGT GGG CTT GAA			2861
Val Lys Arg Glu Gly Glu Thr Glu Val Leu Glu Val Ser Gly Leu Glu			
890	895	900	
GTC CCG TCC TTT AAC AGG AGA ACT AAC AAG GCC GAG CTC AAG AGA GTA			2909
Val Pro Ser Phe Asn Arg Arg Thr Asn Lys Ala Glu Leu Lys Arg Val			
905	910	915	
AAG GCC CTG ATT AGG CAC GAT TAT TCT GGC AAG GTC TAC ACC ATC AGA			2957
Lys Ala Leu Ile Arg His Asp Tyr Ser Gly Lys Val Tyr Thr Ile Arg			
920	925	930	
CTG AAG TCG GGG AGG AGA ATA AAG ATA ACC TCT GGC CAC AGC CTC TTC			3005
Leu Lys Ser Gly Arg Arg Ile Lys Ile Thr Ser Gly His Ser Leu Phe			
935	940	945	950
TCT GTG AGA AAC GGG GAG CTC GTT GAA GTT ACG GGC GAT GAA CTA AAG			3053
Ser Val Arg Asn Gly Glu Leu Val Glu Val Thr Gly Asp Glu Leu Lys			
955	960	965	
CCA GGT GAC CTC GTT GCA GTC CCG CGG AGA TTG GAG CTT CCT GAG AGA			3101
Pro Gly Asp Leu Val Ala Val Pro Arg Arg Leu Glu Leu Pro Glu Arg			
970	975	980	
AAC CAC GTG CTG AAC CTC GTT GAA CTG CTC CTT GGA AGC CCA GAA GAA			3149
Asn His Val Leu Asn Leu Val Glu Leu Leu Leu Glu Thr Pro Glu Glu			
985	990	995	
GAA ACT TTG GAC ATC GTC ATG ACC ATC CCA GTC AAG CGT AAG AAG AAC			3197
Glu Thr Leu Asp Ile Val Met Thr Ile Pro Val Lys Gly Lys Lys Asn			
1000	1005	1010	
TTC TTT AAA GGG ATG CTC ACG ACT TTG CGC TGG ATT TTC GGA GAG GAA			3245
Phe Phe Lys Gly Met Leu Arg Thr Leu Arg Trp Ile Phe Gly Glu Glu			
1015	1020	1025	1030
AAG ACG CCC AGA ACC CGG AGA CGC TAT CTC AGG CAC CTT GAG GAT CTG			3293

35

36

Lys Arg Pro Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Leu Arg His Leu Glu Asp Leu  
 1035 1040 1045  
 CGC TAT GTC CGG CTT AAG AAG ATC GGC TAC GAA GTC CTC GAC TGG GAC 3341  
 Gly Tyr Val Arg Leu Lys Lys Ile Gly Tyr Glu Val Leu Asp Trp Asp  
 1050 1055 1060  
 TCA CTT AAG AAC TAC AGA AGG CTC TAC GAG CGG CTT GTC GAG AAC GTC 3389  
 Ser Leu Lys Asn Tyr Arg Arg Leu Tyr Glu Ala Leu Val Glu Asn Val  
 1065 1070 1075  
 AGA TAC AAC GCC AAC AAG AGG GAG TAC CTC GTT GAA TTC AAT TCC ATC 3437  
 Arg Tyr Asn Gly Asn Lys Arg Glu Tyr Leu Val Glu Phe Asn Ser Ile  
 1080 1085 1090  
 CGG GAT GCA GTT CGC ATA ATG CCC CTA AAA GAG CTG AAG GAG TGG AAG 3485  
 Arg Asp Ala Val Gly Ile Met Pro Leu Lys Glu Leu Lys Glu Trp Lys  
 1095 1100 1105 1110  
 ATC GCC ACG CTG AAC CGC TTC AGA ATG AGA AAG CTC ATT GAA GTG GAC 3533  
 Ile Gly Thr Leu Asn Gly Phe Arg Met Arg Lys Leu Ile Glu Val Asp  
 1115 1120 1125  
 GAG TCG TTA GCA AAG CTC CTC CGC TAC TAC GTG ACC GAG GGC TAT CCA 3581  
 Glu Ser Leu Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Tyr Val Ser Glu Gly Tyr Ala  
 1130 1135 1140  
 AGA AAG CAG AGG AAT CCC AAA AAC CGC TGG AGC TAC AGC GTG AAG CTC 3629  
 Arg Lys Gln Arg Asn Pro Lys Asn Gly Trp Ser Tyr Ser Val Lys Leu  
 1145 1150 1155  
 TAC AAC GAA GAC CCT GAA GTG CTG GAC GAT ATG GAG AGA CTC GCC AGC 3677  
 Tyr Asn Glu Asp Pro Glu Val Leu Asp Asp Met Glu Arg Leu Ala Ser  
 1160 1165 1170  
 AGG TTT TTC CGG AAG GTG AGG CGG CGG AGG AAC TAC GTT GAG ATA CGG 3725  
 Arg Phe Phe Gly Lys Val Arg Arg Gly Arg Asn Tyr Val Glu Ile Pro  
 1175 1180 1185 1190  
 AAG AAG ATC CGC TAC CTG CTC TTT GAG AAC ATG TCC GGT GTC CTA CGG 3773  
 Lys Lys Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Glu Asn Met Cys Gly Val Leu Ala  
 1195 1200 1205  
 GAG AAC AAG AGG ATT CCC GAG TTC GTC TTC ACG TCC CCG AAA CGG GTT 3821  
 Glu Asn Lys Arg Ile Pro Glu Phe Val Phe Thr Ser Pro Lys Gly Val  
 1210 1215 1220  
 CGG CTG GCC TTC CTT GAG CGG TAC TCA TCG CGG ATG CGG ACC TCC ACC 3869  
 Arg Leu Ala Phe Leu Glu Gly Tyr Ser Ser Ala Met Ala Thr Ser Thr  
 1225 1230 1235  
 GAA CAA GAG ACT CAG CCT CTC AAC GAA AAG CGA CCT TTA CGG AAC CAG 3917  
 Glu Gln Glu Thr Gln Ala Leu Asn Glu Lys Arg Ala Leu Ala Asn Gln  
 1240 1245 1250  
 CTC GTC CTC CTC TTG AAC TCG GTG CGG GTC TCT CCT GTA AAA CTT CGG 3965  
 Leu Val Leu Leu Asn Ser Val Gly Val Ser Ala Val Lys Leu Gly  
 1255 1260 1265 1270  
 CAC GAC AGC CGC GTT TAC AGC GTC TAT ATA AAC GAG GAG CTC CCG TTC 4013  
 His Asp Ser Gly Val Tyr Arg Val Tyr Ile Asn Glu Glu Leu Pro Phe  
 1275 1280 1285  
 GTA AAG CTG GAC AAG AAA AAC CGC TAC TAC TCA CAC GTG ATC CCC 4061  
 Val Lys Leu Asp Lys Lys Lys Asn Ala Tyr Tyr Ser His Val Ile Pro  
 1290 1295 1300

37

38

AAG GAA GTC CTG AGC GAG GTC TTT GGG AAG GTT TTC CAG AAA AAC GTC 4109  
 Lys Glu Val Leu Ser Glu Val Phe Gly Lys Val Phe Gln Lys Asn Val  
 1305 1310 1315  
 AGT CCT CAG ACC TTC AGG AAG ATG GTC GAG GAC GGA AGA CTC GAT CCC 4157  
 Ser Pro Gln Thr Phe Arg Lys Met Val Glu Asp Gly Arg Leu Asp Pro  
 1320 1325 1330  
 CAA AAG GCC CAG AGG CTC TCC TGG CTC ATT GAG GCG GAC GTC GTG CTC 4205  
 Glu Lys Ala Gln Arg Leu Ser Trp Leu Ile Glu Gly Asp Val Val Leu  
 1335 1340 1345 1350  
 GAC CGC GTT GAG TCC GTT GAT GTG GAA GAC TAC GAT GGT TAT GTC TAT 4253  
 Asp Arg Val Glu Ser Val Asp Val Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Val Tyr  
 1355 1360 1365  
 GAC CTG AGC GTC GAG GAC AAC GAG AAC TTC CTC GTT GGC TTT GGG TTG 4301  
 Asp Leu Ser Val Glu Asp Asn Glu Asn Phe Leu Val Gly Phe Gly Leu  
 1370 1375 1380  
 GTC TAT GCT CAC AAC ACC TAC TAC GGT TAC TAC GGC TAT GCA AGG GCG 4349  
 Val Tyr Ala His Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala  
 1385 1390 1395  
 CGC TGG TAC TCC AAG GAG TGT GCA GAG AGC GTC ACG GCC TGG GGA AGG 4397  
 Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg  
 1400 1405 1410  
 GAG TAC ATA ACG ATG ACC ATC AAG GAG ATA GAG GAA AAG TAC GGC TTT 4445  
 Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile Glu Glu Lys Tyr Gly Phe  
 1415 1420 1425 1430  
 AAG GTA ATC TAC ACC GAC ACC GAC GGA TTT TTT GCC ACA ATA CCT GGA 4493  
 Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly  
 1435 1440 1445  
 CCC GAT GCT GAA ACC GTC AAA AAG AAC GCT ATG GAG TTC CTC AAC TAT 4541  
 Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Ala Met Glu Phe Leu Asn Tyr  
 1450 1455 1460  
 ATC AAC GCC AAA CTT CCG GCC GCG CTT GAG TAC GAG GGC TTC 4589  
 Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe  
 1465 1470 1475  
 TAC AAA CGC GGC TTC GTC ACG AAC AAG AAG TAT GCG GTG ATA GAC 4637  
 Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp  
 1480 1485 1490  
 GAG GAA CGC AAG ATA ACA ACG CGC GGA CTT GAG ATT GTG AGG CGT GAC 4685  
 Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp  
 1495 1500 1505 1510  
 TGG ACC GAG ATA GCG AAA GAG ACG CAG GCG AGG GTT CTT GAA GCT TTG 4733  
 Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala Arg Val Leu Glu Ala Leu  
 1515 1520 1525  
 CTA AAG GAC GGT GAC GTC GAG AAG GCC GTG AGG ATA GTC AAA GAA GTT 4781  
 Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val  
 1530 1535 1540  
 ACC GAA AAG CTG AGC AAG TAC GAG GTT CCG CCG GAG AAG CTG GTG ATC 4829  
 Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile  
 1545 1550 1555  
 CAC GAG CAG ATA ACG AGG GAT TTA AAG GAC TAC AAG GCA ACC GGT CCC 4877  
 His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro

39	1560	1565	1570	40
CAC GTT GCC GTT GCC AAG ACG TTG GCC GCG AGA GGA GTC AAA ATA CGC				4925
His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Val Lys Ile Arg				
1575	1580	1585	1590	
CCT GGA ACG GTG ATA AGC TAC ATC GTG CTC AAG GCC TCT GGG AGG ATA				4973
Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile				
1595	1600	1605		
GGC GAC AGG GCG ATA CCG TTC GAC GAG TTC GAC CCG ACG AAG CAC AAG				5021
Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe Asp Pro Thr Lys His Lys				
1610	1615	1620		
TAC GAC GCC GAG TAC TAC ATT GAG AAC CAG GTT CTC CCA GCC GTT GAG				5069
Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Glu				
1625	1630	1635		
AGA ATT CTG AGA GCC TTC GGT TAC CGC AAG GAA GAC CTG CGC TAC CAG				5117
Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln				
1640	1645	1650		
AAG ACG AGA CAG GTT CGT TTG AGT GCT TGG CTG AAG CCG AAG GGA ACT				5165
Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp Leu Lys Pro Lys Gly Thr				
1655	1660	1665	1670	
TGACCTTTCC ATTTGTTTC CAGCGGATAA CCCTTTAACT TCCCTTCAA AAACCTCCCTT				5225
TAGGGAAAGA CCATGAAGAT AGAAATCCCG CGCCGCCCGG TTAAATACCG TAGGATAGAA				5285
GTGAACCCAG ACCGGAGGGT AGTCGTCACT GCCCCGAGGG TTCAACGTTG AGAAGTT				5342

【0080】配列番号：2

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：774

配列の種類：蛋白質

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Met	Ile	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ile
1															
5 10 15															
Arg	Ile	Phe	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Glu	Phe	Lys	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg
20 25 30															
Thr	Phe	Glu	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Ser	Ala	Ile
35 40 45															
Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Arg	His	Gly	Thr	Val	Val	Thr
50 55 60															
Val	Lys	Arg	Val	Glu	Lys	Val	Gln	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Arg	Pro	Val
65 70 75 80															
Glu	Val	Trp	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Pro	Gln	Asp	Val	Pro	Ala	Ile
85 90 95															
Arg	Asp	Lys	Ile	Arg	Glu	His	Gly	Ala	Val	Ile	Asp	Ile	Tyr	Glu	Tyr
100 105 110															
Asp	Ile	Pro	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asp	Lys	Gly	Leu	Val	Pro
115 120 125															
Met	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Met	Leu	Ala	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr
130 135 140															
Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Glu	Glu	Phe	Ala	Glu	Gly	Pro	Ile	Leu	Met	Ile
145 150 155 160															
Ser	Tyr	Ala	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Arg	Val	Ile	Thr	Trp	Lys	Asn	Val
165 170 175															
Asp	Leu	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Val	Ser	Thr	Glu	Arg	Glu	Met	Ile	Lys
180 185 190															

41

42

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr  
 195 200 205  
 Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu  
 210 215 220  
 Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile  
 245 250 255  
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr  
 260 265 270  
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu  
 275 280 285  
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn  
 290 295 300  
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu  
 325 330 335  
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu  
 340 345 350  
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala  
 355 360 365  
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr  
 370 375 380  
 Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile  
 385 390 395 400  
 Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His  
 405 410 415  
 Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp  
 420 425 430  
 Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe  
 435 440 445  
 Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys  
 450 455 460  
 Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp  
 465 470 475 480  
 Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr  
 485 490 495  
 Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser  
 500 505 510  
 Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile  
 515 520 525  
 Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe  
 530 535 540  
 Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Ala  
 545 550 555 560  
 Met Glu Phe Leu Asn Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu  
 565 570 575  
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys  
 580 585 590

43

44

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu  
 595 600 605  
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala  
 610 615 620  
 Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val  
 625 630 635 640  
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro  
 645 650 655  
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp  
 660 665 670  
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala  
 675 680 685  
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu  
 690 695 700  
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe  
 705 710 715 720  
 Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln  
 725 730 735  
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys  
 740 745 750  
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp  
 755 760 765  
 Leu Lys Pro Lys Gly Thr  
 770

【0081】配列番号：3

\* 鎖の数：2本鎖

配列の長さ：2325

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸（DNA）

\* 配列の種類：genomic DNA

配列

ATGATCCTCG AACTGACTA CATAACCGAG GATGGAAGC CTGTCTAAAG AATTTCAAG 60  
 AAGGAAACG CGCAGTTAA GATTGAGTAC GACCGGACTT TTGAAACCTA CTTCTACGCC 120  
 CTCCCTAAGG ACCATTCTGC CATTGAGGAA GTCAAGAAGA TAACCGCCGA CAGGCACGGG 180  
 ACGGTTGAA CGGTTAACGG CGGTGAAAAG GTTCAGAAGA AGTTCTCGG GAGACAGTT 240  
 CAGGTCTGGA AACTCTACTT TACTCATCCG CAGGACGTCC CAGCGATAAG GGACAAGATA 300  
 CGAGGACATG GAGCAGTTAT TGACATCTAC GAGTACGACA TACCTTTCGC CAAGCCCTAC 360  
 CTCATAGACA AGGGATTAGT GCCAATGGAA GCGGACGGAG AGCTGAAAT GCTCGCTTC 420  
 GACATTCAA CTCTCTACCA TGAGGGCGAG GAGTCCCGG AGGGGCAAT CCTTATGATA 480  
 AGCTACCCCG AGCAGGAAGG GGGCAGGGTG ATAACCTGGA AGAACGTGGA TCTCCCTAC 540  
 GTTGACGTCG TCTCGACGGA GAGGGAGATG ATAAAGCGCT TCCCTCGTGT TGTGAAGGAG 600  
 AAAGACCCCG ACCTTCTCAT AACCTACAAC GGGGACAAC TCGACTTCGC CTATCTGAAA 660  
 AAGGGCTGTG AAAAGCTGG AATAAACTTC GCCCTCGAA GGGATGGAAG CGAGCCGAAG 720  
 ATTACAGGA TGGGGACAG GTTGGCGTC GAAAGTGAAGG GACGGATACA CTTCGATCTC 780  
 TATCCTGTGA TAAGACGGAC GATAAACCTG CCCACATACA CCCTGAGGC CGTTTATGAA 840  
 CCCGCTTCG GTCAAGCGAA GGAGAAGGTT TACGCTGAGG AAATAACACC AGCCTGGAA 900  
 ACCGGCCAGA ACCTTGAGAG ACTCCCCCCC TACTCGATGG AAGATGCCA CGTCACATAC 960  
 GACCTGGGA AGGAGTTCTC TCCGATGGAG GCCCAGCTT CTCGCTTAAT CGGCCAGTCC 1020  
 CTCTGGGAGC TCTCCCGTC CAGCACTGCC AACCTCGTG AGTGGTTCTC CCTCAGGAAG 1080  
 CCCTATGAGA GGAATGAGCT GGGCCCGAAC AACCCCCGATG AAAAGGAGCT CGCCAGAAGA 1140  
 CGGGAGAGCT ATGAAGGAGG CTATGAAAAA GACCCGAGA GAGGGTTGTG CGAGAACATA 1200  
 GTGTACCTAG ATTTAGATC CCTGTACCCCC TCAATCATCA TCACCCACAA CGTCTCGCCG 1260  
 GATACGCTCA ACAGAGAAGG ATGCAAGGAA TATGACGTTG CCCCCACAGGT CGGCCACCCG 1320

45

46

TTCTCCAAGG ACTTCCCAGG ATTATCCCG AGCCTGCTTG GAGACCTCCT AGAGGAGAGG 1380  
 CAGAAGATAA AGAAGAAGAT GAAGGCCACG ATTGACCCGA TCGAGAGGAA GCTCCTCGAT 1440  
 TAGAGGCAGA GGGCCATCAA GATCCTGGCA AACAGCTACT ACGGTTACTA CGGCTATGCA 1500  
 AGGGCCCGCT GGTACTGCAA GGAGTGTGCA GAGACCGTAA CGCCCTGGG AAGGGAGTAC 1560  
 ATAACGATGA CCATCAAGGA GATAGAGGAA AAGTACGGCT TTAAGGTAAT CTACACGGAC 1620  
 ACCGACGGAT TTTTGCCAC AATACCTGGA GCGGATGCTG AAACCGTAA AAAGAAGGCT 1680  
 ATGGAGTTCC TCAACTATAT CAACGCCAAA CTTCGGGGCC CCGTTGAGCT CGAGTACGAG 1740  
 CGCTCTACA AACGCCGCTT CTTGTCACG AAGAAGAAGT ATGCGGTGAT AGACCGAGGA 1800  
 CCGAAGATAA CAACCCGGG ACTTGAGATT GTGAGGGTGTG ACTGGACCGA GATACGGAA 1860  
 CAGACCCAGG CGAGGGTTCT TGAAGGTTTG CTAAAGGACG GTGACGGTCA CGACGGCGT 1920  
 AGGATAGTCA AAGAAGTTAC CGAAAAGCTG ACCAAGTACG AGGTTCCGCC CGAGAAGCTG 1980  
 GTGATCCACG ACCAGATAAC GAGGGATTAA AAGGACTACA ACCAACCGG TCCCCACGTT 2040  
 CCGCTTGCCA AGAGGTTGGC CGCCAGAGGA GTCAAATAC GCCCTGGAAC CGTGATAACC 2100  
 TACATCGTGC TCAACGGCTC TGGGAGGATA GCGGACAGGG CGATACCGTT CGACGAGTTC 2160  
 CACCCGACGA AGCACAAGTA CGACCCGAG TACTACATT AGAACCCAGGT TCTCCCAGCC 2220  
 GTTGAGAGAA TTCTGAGGAC CTTCGGTTAC CGCAAGGAAG ACCTGGCTA CCAGAAGAGC 2280  
 AGACAGGTTG TTTCAGTGC TTGCGTGAAG CCCAAGGGAA CTTCA 2325

【0082】配列番号：4

配列の長さ：30

配列の長さ：24

配列の型：核酸（DNA）

20 鎖の数：1本鎖

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCCTCGTGG TAGAGAGTTG CAATGTGAA 30

CTTTGCTCA GATCTTCTTT CCTG

24

【0083】配列番号：5

【0087】配列番号：9

配列の長さ：36

配列の長さ：32

配列の型：核酸（DNA）

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列 32

配列

CGGACGTACT GATAACGTAC GACGGTGACA AC 32

CAGGAAGAA GATCTGAGCA AAAG

24

【0084】配列番号：6

【0088】配列番号：10

配列の長さ：36

配列の長さ：33

配列の型：核酸（DNA）

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列 33

配列

CCTTGAGAGA GTCGCCGCT TCTCGATGGA AGA 33

CTGAAATGC TCGCCTTCGC GATTGAACT CTCTAC

36

【0085】配列番号：7

【0089】配列番号：11

配列の長さ：33

配列の長さ：35

配列の型：核酸（DNA）

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列 35

配列

TGGCTAGCCA AGGAACCACC AGTTGATTAG CAGAG 35

CTGAAATGC TCGCCTTCGC GATTGAACT CTCT

34

【0086】配列番号：8

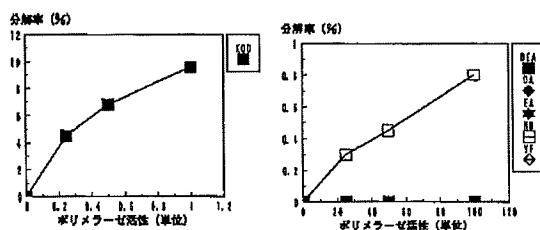
【0090】配列番号：12

50 配列の長さ：35

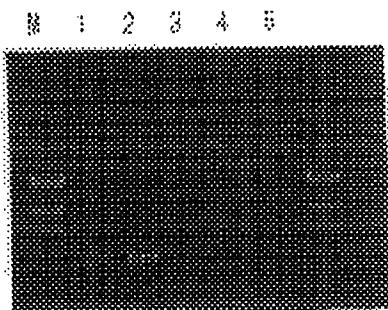
配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 ATAAGAGGTC CCAAGACTTA GTACCTGAAG GGTGA 36  
 【0091】配列番号：13  
 配列の長さ：24  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGAC 24  
 【0092】配列番号：14  
 配列の長さ：24  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 CTTTTGCTCA GATCTTCTTT CCTG 24  
 【0093】配列番号：15  
 配列の長さ：36  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 AGCTGAAAAT GCTAGCCCTTC GACAATGAAA CTCTCT 36  
 【0094】配列番号：16  
 配列の長さ：36  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 AGCTGAAAAT GCTAGCCCTTC GACCAAGAAA CTCTCT 36  
 【0095】配列番号：17  
 配列の長さ：33  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 GAAAATGCTC GCCTTGATC AAGAAACTCT CTA 33  
 【0096】配列番号：18  
 配列の長さ：36  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 配列  
 AGCTGAAAAT GCTAGCCCTTC GACCATGAAA CTCTCT 36

【0097】配列番号：19  
 配列の長さ：30  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 CGCCTTCGAC ATTGAAGTAC TCTACCATGA 30  
 【0098】配列番号：20  
 配列の長さ：36  
 10 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 AGCTGAAAAT GCTAGCCCTTC GACAGAGAAA CTCTCT 36  
 【0099】配列番号：21  
 配列の長さ：36  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 20 配列の種類：合成D N A  
 AGCTGAAAAT GCTAGCCCTTC GACAAAGAAA CTCTCT 36  
 【0100】配列番号：22  
 配列の長さ：35  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 AAAAAGTACT CACCAAGTCAC AGAAAAGCAT CTTAC 35  
 【0101】配列番号：23  
 30 配列の長さ：34  
 配列の型：核酸（D N A）  
 鎖の数：1本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：合成D N A  
 AAAAAGTACT CAACCAAGTC ATTCTTGAGA ATAGT 34  
 【図面の簡単な説明】  
 【図1】改変型D N Aポリメラーゼのポリメラーゼ活性とD N A分解率を示す図である。  
 【図2】改変型D N Aポリメラーゼの熱安定性を示す図である。  
 40 【図3】D N Aポリメラーゼ組成物を用いたPCR（ヒトゲノム）の結果を示す図である。  
 【図4】耐熱性D N Aポリメラーゼのエキソ（EXO）領域のアミノ酸配列を示す図である。  
 【図5】改変型D N Aポリメラーゼのポリメラーゼ活性とD N A分解率を示す図である。  
 【図6】天然型KODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比率を示す図である。

【図1】

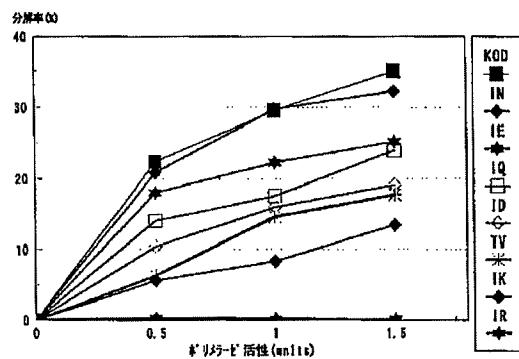


【図3】

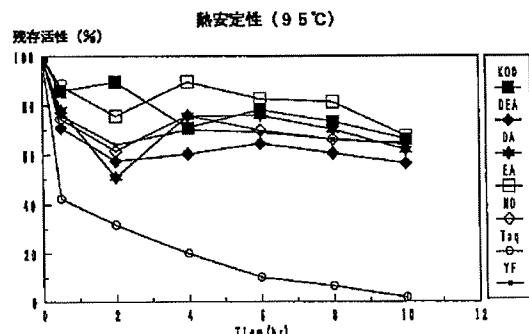


Lane 1: ND  
 2: 80+KOD  
 3: Advantage™ Thermo (90-100%活性)  
 4: Ex Taq (90%活性)  
 5: Taq (90%活性)  
 6: KOD (80-100%活性)

【図5】



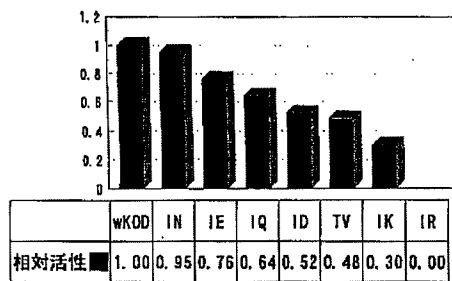
【図2】



【図4】

KOD	EXO I	EXO II	EXO III
Pfu	MLAPDIELTY	LITYNGDNFDPEAYLKKR	VAKYSMEDAKV
Vent	ILAPDIELTY	LITYNGDSDPEPYLAKR	VAKYSMEDAKA
Deep Vent	LLAPDIELTY	LITYNGDNFDPEYLINK	VAKYSMEDAKA
	LLAPDIELTY	LITYNGDSDPEPYLPKR	VAKYSMEDAKV

【図6】



## 【手続補正書】

【提出日】平成8年9月2日

\* 【補正方法】変更

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

## 【補正内容】

【補正対象項目名】図3

【図3】DNAポリメラーゼ組成物を用いたPCR

\* (ヒトゲノム)の結果を示す電気泳動の写真である。

## フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 高木 昌宏

大阪府吹田市青山台1-3 C-58-207

(72)発明者 今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号